

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：16201

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K14760

研究課題名（和文）ミヤコグサと根粒菌の協調的な硫黄代謝メカニズムの解明

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism of cooperative sulfur metabolism between *Lotus japonicus* and *Mesorhizobium loti*.

研究代表者

福留 光拳（Fukudome, Mitsutaka）

香川大学・農学部・助教

研究者番号：40882949

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、ミヤコグサと根粒菌の共生中に産生される活性イオウ分子種（RSS）の分子構造と代謝メカニズムを解明することを目的とした。RSS産生酵素（シスタチオンin リアーゼ、システイニル-tRNA合成酵素、3-メルカプトピルビン酸硫黄転移酵素）の変異株を用いた解析により、これらの酵素が硫黄代謝とアミノ酸代謝に及ぼす影響を明らかにした。特に、変異株の着生根粒でRSS量が減少し、共生の安定性が低下することを発見した。本研究は、根粒共生における硫黄代謝の重要性を再評価し、根粒共生での役割の理解を深める、新たな知見を提供した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、根粒共生における活性イオウ分子種（RSS）の役割を詳細に検討し、硫黄代謝が共生の安定性に不可欠であることを示した。これらの結果は、植物と微生物の共生メカニズムの理解に新たな視点を提供する可能性がある。また、基礎的な情報基盤だけでなく、持続可能な農業技術の開発に貢献する可能性がある。硫黄代謝の理解が進むことで、低肥料環境での作物生産性の向上や、環境負荷の軽減が期待できる。

研究成果の概要（英文）：This research aimed to elucidate the molecular structure and metabolic mechanisms of reactive sulfur species (RSS) produced during the symbiotic interaction between *Lotus japonicus* and *Mesorhizobium loti*. By analyzing mutant strains of *M. loti* with altered genes for RSS-producing enzymes (cystathionine gamma-lyase, cysteinyl-tRNA synthetase, and 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase), we identified the effects of these enzymes on sulfur and amino acid metabolism. Specifically, we found that the amount of RSS decreased in nodules formed by the mutant strains, leading to a reduced stability of the symbiosis. This study re-evaluates the importance of sulfur metabolism in nodule symbiosis and provides new insights into the role of sulfur metabolism in root nodule symbiosis.

研究分野：マメ科植物と根粒菌の根粒共生

キーワード：活性イオウ分子種 根粒共生 植物微生物間相互作用 硫黄代謝 ミヤコグサ 根粒菌 活性分子種

1. 研究開始当初の背景

マメ科植物は根粒菌と共生窒素固定を行うことで、大気中の窒素ガスから窒素栄養を得ることができる。この共生過程において、「硫黄」は窒素固定酵素（ニトロゲナーゼ）等の共生必須分子の構成要素として不可欠であることが知られている。しかし、硫黄代謝産物は安定性が低く分析が困難なため、硫黄のその他の役割や代謝経路については、これまでほとんど明らかにされていなかった。これまで、シスタチオニッリナーゼ（CSE）、システイニル tRNA 合成酵素（CARS）、3-メルカプトピルビン酸硫黄転移酵素（3MST）が哺乳動物や微生物における活性イオウ分子種（RSS）産生に重要な役割を果たすことが示されている。一方で、植物生理や根粒共生への関わりや機能は未解明であった。そこで、マメ科のモデル植物であるミヤコグサの根粒共生系について、最近急速に発展している硫黄分析技術を用いて、RSS 産生酵素がどのように共生に関与するのか検討し、根粒共生における RSS の役割を評価した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、「ミヤコグサと根粒菌の共生における活性イオウ分子種（RSS）の役割とその産生メカニズムを理解する」ことにある。具体的には、RSS 産生に関与するシスタチオニッリナーゼ（CSE）、システイニル tRNA 合成酵素（CARS）、および 3-メルカプトピルビン酸硫黄転移酵素（3MST）の各酵素が、共生器官である「根粒」内の硫黄代謝とアミノ酸代謝にどのように影響を与えるかを明らかにすることを目指している。

これまでの研究で、上記の酵素が動物や微生物での RSS 産生に重要な役割を果たしていることは知られていたが、植物、特に根粒共生系における具体的な機能は未解明であった。本研究では、これらの酵素の変異根粒菌を用いて、根粒共生における RSS の産生機序とその役割を解析する。本研究は、根粒共生における RSS の役割に新たな知見を提供し、植物と微生物の共生機構の理解を深めることも広義の目的としている。

3. 研究の方法

本研究は、ミヤコグサと根粒菌の共生過程における活性イオウ分子種（RSS）の役割と生成メカニズムを明らかにするため、RSS 産生に関与する 3 つの主要酵素の遺伝子を欠失した変異根粒菌株を使用した。これらの変異株をミヤコグサに感染させ、野生型と比較することで、共生表現型、および、RSS 産生、硫黄・アミノ酸代謝への影響を評価した。具体的には、以下の方法を実施した。

(1).根粒共生表現型の測定：ミヤコグサに各種変異株を接種し、宿主植物の生長と根粒の数・重量を測定した。また、アセチレン還元法を用いて、根粒の窒素固定活性を測定した。これらの結果より、根粒菌の RSS 産生酵素の欠損が根粒共生や窒素固定に及ぼす影響を評価した。

(2).根粒内 RSS 量の測定：RSS 特異的蛍光プローブを使用して、根粒内の RSS 量を簡易的に定性した。サルフェン硫黄と硫化水素の特異的プローブの 2 種を用いて検討した。これらの結果より、根粒菌の RSS 産生酵素の欠損が、根粒内 RSS 量に及ぼす影響を評価した。

(3).硫黄代謝産物とアミノ酸の分析:サルファーインデックス解析および高感度質量分析により、根粒内の硫黄代謝産物とアミノ酸のプロファイルを網羅的に解析した。これらの結果より、根粒菌の RSS 産生酵素の欠損が、根粒の硫黄代謝およびアミノ酸代謝に及ぼす影響を評価した。

(4).遺伝子発現の解析：RNA-seq およびリアルタイム PCR を使用して、根粒での硫黄・アミノ酸代謝関連遺伝子の発現レベル、および、共生関連遺伝子の発現レベルを測定した。これらの結果より、根粒菌の RSS 産生酵素の欠損が、根粒内の代謝全般に及ぼす影響と共生安定性に及ぼす影響を、遺伝子発現の観点から評価した。

上記の方法を介して、RSS が根粒共生においてどのような役割を持っているのか検討した。また、共生根粒菌の RSS 産生酵素が、それぞれ根粒内での硫黄代謝とアミノ酸代謝にどのように寄与しているかを詳細に評価した。

4. 研究成果

本研究は、ミヤコグサと根粒菌の共生における活性イオウ分子種（RSS）の役割を解明するため、シスタチオニッリナーゼ（CSE）、システイニル tRNA 合成酵素（CARS）、および 3-メルカプトピルビン酸硫黄転移酵素（3MST）の各酵素に焦点を当て、それぞれの変異根粒菌を用いて詳細な解析を行った。以下に各変異株についての研究成果を示す。

(1). シスタチオンin γ リアーゼ (CSE)

cse 変異株が感染した根粒は、窒素固定活性が低く、早期に老化することが観察された。また、長期間生育した場合、宿主植物の生長が野生株接種時と比べ矮小化した。この結果は、根粒菌の CSE が正常な根粒共生の成立と維持に不可欠であることを示している。また、*cse* 変異株の感染した根粒では、RSS 産生量が著しく減少し、同時に、活性酸素種 (ROS) の蓄積量が増加していた。RSS は強い抗酸化活性を持つことから、RSS の減少に伴い根粒内で ROS 量の増加が誘導された可能性が示唆された。サルファーインデックス解析により、*cse* 変異株が感染

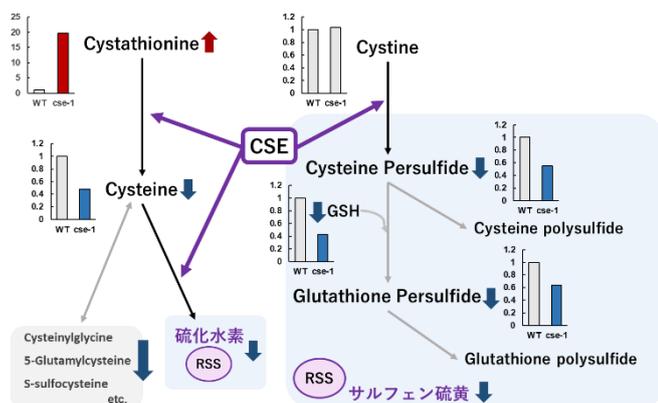


図 1. CSE の関与する硫黄代謝経路と *cse* 変異株の感染根粒で減少した主な RSS

した根粒の硫黄代謝産物を網羅的に解析した結果、複数の硫黄化合物の量が野生型と比較して大きく変動していた。特に、RSS の前駆体となる硫黄化合物が減少しており、CSE が硫黄代謝全般において重要な役割を果たしていることが示された。また、主要な RSS であるシステインパースルフィドとグルタチオンパースルフィドの量が大幅に減少しており、共生根粒菌の CSE がこれらの RSS の産生に直接的に重要な役割を果たしている可能性が示された (図 1)。リアルタイム PCR による遺伝子発現解析では、*cse* 変異株が感染した根粒において、根粒老化に関与する複数の遺伝子の発現量が上昇していることが確認された。これにより、CSE が共生の安定性に寄与することが示唆された。これらの結果から、根粒菌の CSE が根粒内の RSS 産生に機能しながら、正常な共生窒素固定の確立に寄与していることが分かった。さらに、ミヤコグサを CSE 阻害剤で処理することで根粒共生の初期段階が阻害されたことから、根粒菌だけではなく宿主植物の CSE も共生確立に重要な役割を持っている可能性が示唆された。上記の成果をまとめ、*Microbes and Environments* 誌に投稿した。

(2). システイニル tRNA 合成酵素 (CARS)

cars 変異株を用いた解析でも、根粒内の RSS 量が著しく減少することが確認された。特に、*cse* 変異株と同様にシステインパースルフィドとグルタチオンパースルフィドの量が大幅に減少しており、CARS がこれらの RSS 産生に重要な役割を果たしていることが示された。また、*cars* 変異株が感染した根粒は窒素固定活性が低く、宿主植物であるミヤコグサの生長も野生株感染時と比べ矮小化した。同時に、根粒サイズが小さく重量も軽いことから、根粒器官の発達にも関与している可能性が示唆された。さらに、*cars* 変異株が感染した根粒も *cse* 変異株と同様に早期に老化することが観察された。これらの結果から、CARS が共生の確立から共生維持までの幅広い過程で不可欠であることが示された。高感度質量分析により *cars* 変異株が感染した根粒のアミノ酸プロファイル解析した結果、すべての含硫アミノ酸量が減少していた。さらに、サルファーインデックス解析により、根粒の硫黄代謝産物のプロファイル解析した結果、ほとんどの硫黄化合物量が野生株感染時と比べ減少していた。RSS や RSS 前駆体となる硫黄化合物も多くが減少しており、根粒菌の CARS が RSS 産生を含む硫黄代謝全般において重要な役割を果たしていることが示された。RNA-seq による遺伝子発現解析の結果、*cars* 変異株が感染した根粒では、硫黄代謝に関与する複数の遺伝子の発現レベルが低下していることが確認された。これより、根粒菌の CARS の根粒内硫黄代謝への寄与が、遺伝子発現の観点からも明らかとなった。これらの結果から、根粒菌の CARS もまた、CSE と同様に根粒内の RSS 産生に機能しながら、正常な共生窒素固定の確立に寄与していることが分かった。また、硫黄代謝産物の変動パターンや遺伝子発現、共生表現型の違いから、CARS と CSE の違いも明確となった。上記の成果は、既にデータのとりまとめが完了しており、投稿準備中である。

(3). 3-メルカプトピルピン酸硫黄転移酵素 (3MST)

3mst 変異株を用いた解析により、根粒内の RSS 産生量が減少することが確認された。特に、*cse* および *cars* 変異株と同様にシステインパースルフィドとグルタチオンパースルフィドの量が減少しており、3MST がこれらの RSS の生成にも重要な役割を果たしていることが示された。また、*3mst* 変異株が感染した根粒も窒素固定活性が低かった。これにより、根粒菌の 3MST が正常な共生窒素固定に必要であることが示された。サルファーインデックス解析により、*3mst* 変異株が感染した根粒の硫黄代謝産物を解析した結果、複数の硫黄化合物の量が野生株と比較して変動していた。硫黄化合物量の変動パターンは *cse* および *cars* 変異株と似ているものの、独立した点も有していた。*3mst* 変異株を用いた実験では、RNA-seq などの網羅的な遺伝子発現解析を実施できておらず、今後の課題である。遺伝子発現の変動パターンを *cse* および *cars* 変異株と比較することで、各 RSS 産生酵素の共通点および相違点をより詳細に検討することが可能になると考えられる。

(4). 結論

本研究により、根粒菌の CSE、CARS、3MST の各酵素がミヤコグサの根粒共生において重要な役割を果たしていることが明らかとなった。これらの酵素が欠損することにより、根粒内でのアミノ酸代謝および硫黄代謝に異常が生じ、RSS 産生量が減少し、結果として根粒の窒素固定活性低下や早期老化が誘導されることが示された (図2)。RSS 産生量や硫黄代謝の変化が共生に及ぼす影響の詳細な解明については今後の課題であるものの、本成果は、RSS が根粒共生の確立と安定性の維持に必要であることを示している。

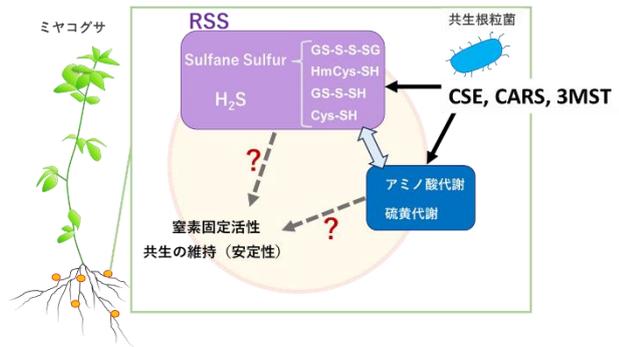


図2. CSE, CARS, 3MSTのRSS代謝と根粒共生への関与

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Fukudome Mitsutaka, Ishizaki Haruka, Shimokawa Yuta, Mori Tomoko, Uchi-Fukudome Nahoko, Umnajkitikorn Kamolchanok, Murakami Ei-ichi, Uchiumi Toshiki, Kawaguchi Masayoshi	4. 巻 38
2. 論文標題 Reactive Sulfur Species Produced by Cystathionine -lyase Function in the Establishment of <i>Mesorhizobium loti</i>?<i>Lotus japonicus</i> Symbiosis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Microbes and Environments	6. 最初と最後の頁 n/a ~ n/a
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1264/j sme2.me23021	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計18件（うち招待講演 3件/うち国際学会 7件）

1. 発表者名 Fukudome M., Becana M., Uchiumi T.
2. 発表標題 Regulation of reactive molecular species by phytohemoglobin 1 in <i>Lotus japonicus</i> contributes to plant-microbe symbioses.
3. 学会等名 The 12th International Conference on the Biology, Chemistry, and Therapeutic Applications of Nitric Oxide. (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Fukudome M., Shimokawa Y., Uchiumi T., Kawaguchi M.
2. 発表標題 Effect of iron for the growth and symbiosis in <i>Lotus japonicus</i> nodule.
3. 学会等名 Kagawa International Forum on Advanced Genomics, Environmental and Resource Genomics and Life Sciences. (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 福留光拳, 内海俊樹.
2. 発表標題 菌根共生におけるクラス1植物ヘモグロビンの役割
3. 学会等名 九州沖縄植物学会 (第71回)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 下川友太, 福留光拳, 内海俊樹.
2. 発表標題 ミヤコグサの葉におけるクラス1植物ヘモグロビンの役割
3. 学会等名 九州沖縄植物学会 (第71回)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 福留光拳, 下川友太, 内海俊樹, 川口正代司.
2. 発表標題 根粒共生時における根粒菌シスタチオニンリアーゼによる活性硫黄分子種の産生
3. 学会等名 植物微生物研究会 第31回研究交流会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Fukudome M., Shimokawa Y., Uchiumi T., Kawaguchi M.
2. 発表標題 Role of cystathionine γ -lyase of <i>Mesorhizobium loti</i> in root nodule symbiosis.
3. 学会等名 第64回植物生理学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Uchiumi T., Shimokawa Y., Fukudome M.
2. 発表標題 Function of class 1 phytoglobins in the leaves of <i>Lotus japonicus</i> .
3. 学会等名 第64回植物生理学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 福留光拳, 下川友太, 内海俊樹, 川口正代司
2. 発表標題 活性イオウ分子種の根粒共生への関与-根粒共生のなかで活性イオウ分子種はどのように産生されどんな機能を示すのか-
3. 学会等名 日本土壤肥料学会関西支部・関西土壤肥料協議会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 福留光拳, 下川友太, 内海俊樹
2. 発表標題 根粒菌の一酸化窒素制御がマメ科植物との根粒共生に及ぼす影響-hmp遺伝子の導入による根粒菌のNO制御能強化は根粒共生の強化に寄与するか-
3. 学会等名 日本土壤肥料学会関西支部・関西土壤肥料協議会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 下川友太, 福留光拳, 前迫優輔, 橋本駿, 内海俊樹
2. 発表標題 NO除去能を増強したミヤコグサ根粒菌の共生表現型に関する研究
3. 学会等名 九州沖縄植物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 福留光拳
2. 発表標題 マメ科植物-根粒菌の共生を支える活性分子種の制御機構
3. 学会等名 香川大学 ゲノム・遺伝子源解析センター講演（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 福留光拳, 生田愛珠佳, 内海俊樹, 野村美加
2. 発表標題 Mesorhizobium lotiのシステイニルtRNA合成酵素の根粒共生での役割
3. 学会等名 植物微生物研究会 第32回研究交流会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Ikuta A., Nomura M., Fukudome M.
2. 発表標題 Role of cysteinyl-tRNA synthetase in root nodule symbiosis.
3. 学会等名 Kagawa International Forum on Advanced Genomics, Environmental and Resource Genomics and Life Sciences. (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Fukudome M., Ikuta A., Nomura M., Uchiumi T.
2. 発表標題 Function of cysteinyl-tRNA synthetase of Mesorhizobium loti in root nodule symbiosis
3. 学会等名 The 6th Asian-Pacific Conference on Plant-Microbe Symbiosis and Nitrogen Fixation (国際学会)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 福留光拳, 生田愛珠佳, 野村美加, 内海俊樹
2. 発表標題 ミヤコグサ根粒共生系におけるMesorhizobium lotiのシステイニルtRNA合成酵素の役割
3. 学会等名 第65回植物生理学会年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Fukudome M.
2. 発表標題 Regulatory mechanism of nitric oxide in plant-microbe symbiosis.
3. 学会等名 Kagawa International Forum on Advanced Genomics, Environmental and Resource Genomics and Life Sciences. (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Fukudome M., Shimokawa Y., Uchiumi T., Kawaguchi M.
2. 発表標題 Metabolism of reactive sulfur species in Lotus japonicus-Mesorhizobium loti symbiosis
3. 学会等名 Kagawa International Forum on Advanced Genomics, Environmental and Resource Genomics and Life Sciences (国際学会)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 城 宜嗣、青野 重利、齋藤 正男 (分担執筆: 福留光拳)	4. 発行年 2022年
2. 出版社 エヌ・ティー・エス	5. 総ページ数 472
3. 書名 ヘムタンパク質の科学	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>本研究課題における受賞 ポスター発表賞 (2nd Prize) Function of cysteinyl-tRNA synthetase of Mesorhizobium loti in root nodule symbiosis, The 6th Asian-Pacific Conference on Plant-Microbe Symbiosis and Nitrogen Fixation. 福留光拳, 生田愛珠佳, 野村美加, 内海俊樹</p> <p>Researchmap https://researchmap.jp/FukudomeMitsutaka</p>
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------